

19636, 11.15

Lane Medical Library

BACTERIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN DER MILCH

IM WINTER 1888/89 IN WÜRZBURG

MIT BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER
MILCHSÄURE BILDENDEN BACTERIEN.



INAUGURAL-DISSERTATION

VERFASST UND DER
HOHEN MEDICINISCHEN FACULTÄT
DER

K. B. JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG
ZUR

ERLANGUNG DER DOCTORWÜRDE

IN DER
MEDICIN, CHIRURGIE UND GEBURTSHÜLFE

VORGELEGT VON

JOHANNES CLAUSS

AUS

RAVOLZHAUSEN (HESSEN-NASSAU).



WÜRZBURG

BECKER'S UNIVERSITÄTS-BUCHDRUCKEREI

1889.

REFERENT:

HERR PROFESSOR DR. KUNKEL.

DEM THEUREN ANDENKEN

SEINES

VERSTORBENEN VATERS

GEWIDMET

VOM VERFASSER.

Die Zersetzungs Vorgänge in der Milch haben zu verschiedenen Zeiten die verschiedensten Erklärungen gefunden. Wie mannigfaltig und weit auseinandergehend diese gewesen sind, veranschaulicht H ü p p e am Anfang seines Werkes, das seine Veröffentlichung fand im II. Band der Mitteilungen aus dem kaiserlichen Gesundheitsamt. Es würde zu weit führen, hier die Litteratur der Milchgährung, wenn auch nur oberflächlich, anzuführen. H ü p p e sagt: „So verlockend es auch ist, die Geschichte der Milchsäuregährung an der Hand der über Gährungsvorgänge entwickelten Anschauungen zu verfolgen, kann ich mich mit Rücksicht auf die Darstellung in K o p p 's Geschichte der Chemie (1843—47 Bd. IV 1847 p. 255—99) um so kürzer fassen, als die Milchsäuregährung als solche gar keine Erwähnung findet.“

Erst der neueren Zeit ist es vergönnt gewesen, Schritt für Schritt die klärenden Thatsachen auf diesem Gebiet zu bringen. Eine Reihe von Arbeiten erschienen, worin die einen die Veränderungen in der Milch chemisch, die andern biologisch zu erklären versuchten.

So glaubt Berzelius (1827 u. 39) an eine Fermentation. Blondeau beobachtet, dass jeder Fermentation eine Bildung vegetabilischer Keime vorausgehe

und jede Gährung begleitet sei von Organismen und befördert werde durch den Sauerstoff.

Den für die Gährung wirksamen Factor dachte man sich also als in einem Ferment bestehend, und suchte dasselbe auch von der Milch zu isoliren.

Pasteur beschrieb ein solches als eine graue Substanz, welche unter dem Mikroskop aus feinsten Kügelchen sich zusammengesetzt zeigte und auf Zuckerlösung übertragen auch als wirksam sich erwies (H ü p p e pag. 316). Zugleich suchte Pasteur nachzuweisen, dass die die Fermentation bewirkenden Keime aus der Luft stammten und nicht durch spontane Generation entstanden zu denken seien.

Da jedoch die scheinbar zuverlässigsten Versuche immer wieder ein Eindringen von Mikroorganismen bei sorgfältiger Entnahme der Milch aus der sie secernirenden Drüse in Abrede stellten, verfiel man immer wieder auf die Ansicht, dass die Milch schon in der sie producirenden Drüse chemisch wirkende Substanz in sich enthalte, die ihre nachherige Zersetzung bedinge, wenn man auch zugab, dass dies Ferment in den niederen Organismen wahrscheinlich sehr verbreitet sei (Hoppe-Seyler, *Physiol. Chemie*, Berlin 1881).

Meissner gelang es, durch Versuche den Nachweis zu liefern, dass Milch, welche unter normalen Verhältnissen bei Anwendung der nötigen Cautelen gegen Eindringen fremder Keime ohne jede Zersetzung conservirt werden kann und nur durch Hineingelangen von Organismen zersetzt wird, und dass kein Milchsäureferment bei der Lactation producirt wird. (H ü p p e pag. 339).

Die endgültige Aufklärung dieser Frage brachte H ü p p e, dem es gelang den *Bacillus* der Milchsäuregährung rein zu züchten und zu zeigen, dass ganz besonders

dieser Mikroorganismus es ist, der die Ursache der spontanen Milchgährung ausmacht.

In der letzten Zeit wurde jedoch nachgewiesen, dass offenbar dem Milchsäurebacillus nicht allein, sondern einer grossen Anzahl von Bakterienarten die Eigenschaft zukommt, aus Kohlehydraten, speciell aus dem Milchzucker der Milch Milchsäure zu bilden; höchstens bestehen in Bezug auf die quantitative Leistungsfähigkeit unter diesen Arten Differenzen. Diese Bakterien gelangen, wie zur Evidenz bewiesen, nur in den Stallungs- und Aufbewahrungsräumen der Milch, in welchen eine Art Localisation der Mikroorganismen gegeben ist, durch die Luft, die Gefässe, die Manipulation frühzeitig in die die Brustdrüse bakterienfrei verlassende Milch. Mit den im Ganzen etwa 15 Bacteriensorten, die die Milchsäuregährung befähigen, ist zweifellos noch bei weitem nicht die Reihe dieser Bakterienarten erschöpft, da wohl an verschiedenen Orten, bei verschiedener Behandlung der Milch wieder ganz verschiedene Fermentorganismen in dieselbe gelangen.

Ich begrüsst es daher mit Freuden, als mir von meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. Lehmann, die Aufgabe gestellt wurde, „bacteriologische Untersuchung der Milch im Winter 1888/89 in Würzburg mit besonderer Berücksichtigung der Milchsäure bildenden Bakterienarten.“ An dieser Stelle möge es mir vergönnt sein, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. Lehmann, für die freundlichst gestellte Aufgabe, als auch für die gütige Anweisung von Seiten des Herrn Prof. Lehmann und dessen Assistenten Herrn Dr. Jessen bei Ausführung derselben meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

Bei der Ausführung dieser Aufgabe galt es im wesentlichen, auf folgende fünf Fragen einzugehen:

1. Pilzgehalt der frischen Milch;
2. Vermehrung der Pilze beim Stehen bei verschiedenen Temperaturen und Veränderungen des Säuregehaltes dabei.
3. Art der Pilze.
4. Lässt sich eine Hand in Hand gehende bacteriologische und chemische Veränderung nachweisen?
5. Gibt die bacteriologische Untersuchung eine Handhabe zur Beurteilung der Milch?

Doch bevor ich zur eigentlichen Beantwortung dieser Fragen komme, will ich noch der Methode gedenken, die bei der bacteriologischen Untersuchung in Anwendung kam.

In erster Linie kam die Plattenmethode nach Koch zur Verwendung. Die dazu nötigen Dosen, Kölbchen, Reagenzgläser etc. wurden bei 160° — 180° $\frac{3}{4}$ Stunden im Sterilisationsapparat gehalten, um sie nach dem Erkalten zu verwenden. Die zur Herausnahme der Milch nötigen Pipetten wurden gereinigt, mit Aether ausgespült, um die MilCHFette zu entfernen, mit Alkohol und destillirtem Wasser nachgespült und über der Gasflamme, während Luft mit einem Gebläse durchgetrieben wurde, innen und aussen getrocknet; sodann wurden sie oben und unten mit Wattepfropfen versehen und unter Drehen solange über der Flamme geglüht, bis die Pfröpfe in der Pipette braun zu werden begannen, circa 5 Minuten lang.

Es kam die vom Reichsgesundheitsamt aus in Gebrauch gebrachte 10⁰/oige Fleischinfuspeptongelatine und 1⁰/oige Agar-Agar in Anwendung.

Die zum Nachweise der von den Milchsäure bildenden Organismen aus Milchzucker umgewandelten Milchsäure dienende Nährlösung hatte folgende Zusammensetzung:

Fleischextract 0,5⁰/₀,
Milchzucker 2,0⁰/₀.

Nach geschehener Neutralisation wurde die Nährlösung 2 Stunden sterilisirt, um sie in grösserer Menge oder auch in Reagenzgläschen zu 10 ccm vertheilt verwenden zu können, die nach dem Einfüllen nochmals eine Stunde sterilisirt wurden.

Um die Säurebildung in der Nährlösung, hervorgerufen durch die in dieselbe geimpften Fermentorganismen, auch äusserlich sichtbar zu machen, wurde zuweilen die Nährlösung mit Lacmus versetzt bis zur violetten Färbung, und zwar wurde dasselbe, damit die Färbung in allen Reagenzgläschen gleichmässig wurde, um etwaige eintretende Farbendifferenzen besser beobachten zu können, schon im Kolben beim Zubereiten der Lösung zugesetzt und nachher in einzelne Reagenzgläser gefüllt.

Die Kartoffelculturen wurden nach der älteren Kochschen Methode angelegt.

Die Plattenculturen wurden ausschliesslich in circa 8 cm weiten Glasdosen angelegt, und zwar kam fast nur Agar dabei in Anwendung, da Vorversuche gezeigt hatten, dass die hiesige Milch eine grosse Anzahl rasch verflüssigender Bakterien enthält, die ein Zählen der Keime in Gelatine unmöglich machen.

Milch bereitete ich mir als Nährboden, indem ich sie zu je 10 ccm in sterilisirte Reagenzgläschen gefüllt eine Stunde lang strömendem Wasserdampf aussetzte. Am anderen Tage wurde sie noch eine Stunde sterilisirt, so dass die Milch monatelang aufbewahrt werden konnte, ohne dass nur die geringsten Gerinnungserscheinungen und Reactionsveränderungen sich bemerklich machten.

Bei den bacteriologischen Zählversuchen kam die Milch in Verdünnungen stets in Anwendung, da mit un-

verdünnter Milch wegen ihres hohen Pilzgehaltes nicht zu arbeiten war.

Die Verdünnung der frischen Milch wurde, ohne dass bei der späteren Umrechnung des Pilzgehaltes von der Verdünnung auf 1 ccm reiner Milch sich beträchtlichere Fehler einschleichen konnten, am zweckmässigsten in der Weise hergestellt, dass mit einer sterilen Pipette 5 ccm Milch aus einem Kölbchen entnommen wurde und mit 100 ccm sterilisirter 0,6⁰/oiger ClNa-Lösung vermischt wurde, und von dieser Mischung 1 ccm mit einer anderen, ebenfalls sterilen, Pipette entnommen und wieder mit 100 ccm ClNa-Lösung vermischt wurde; von dieser letzten Verdünnung wurde 1 ccm zu je einer Platte verbraucht, so dass daraus eine 2121-fache Verdünnung resultirte. (In der Verdünnung 5 : 100 war 1 ccm $\frac{5}{105}$ ccm Milch ($\frac{1}{21}$) enthalten; wurden die $\frac{1}{21}$ ccm wieder mit 100 ccm ClNa-Lösung verdünnt, so enthielt 1 ccm von dieser Mischung $\frac{1}{101.21} = \frac{1}{2121}$ ccm Milch).

Wenn in Brutwärme gestandene Milch zu untersuchen war, verdünnte ich noch stärker und zwar wurden 5 ccm Milch nach tüchtigem Umschütteln mit 100 ccm steriler 0,6⁰/oiger ClNa-Lösung vermischt; von dieser Mischung 5 ccm entnommen und mit 100 ccm ClNa-Lösung versetzt; davon wieder 5 ccm in 100 ccm Kochsalzlösung gebracht, und davon wieder 5 ccm mit 100 ccm ClNa-Lösung vermischt. Von letzterer Verdünnung wurde 1 ccm zu einer Platte verwendet, so dass hierbei eine 194481-fache Verdünnung in Anwendung kam, wobei immer noch bei dem hohen Pilzgehalt der Milch, wenn sie längere Zeit exponirt war, 14—18 Tausend Colonieen sich entwickelten, die sich aber bequem ausbreiten konnten und makroskopisch wie mikroskopisch gut zu beobachten waren.

Ab und zu fand diese Verdünnung auf frische Milch Anwendung, wenn es sich darum handelte, das Wachstum der Colonien zu beobachten und von den isolirten Culturen abzuimpfen.

Nur selten wurden noch andere Verdünnungen $\frac{1}{4000}$, $\frac{1}{1000}$, $\frac{1}{125000}$ in Anwendung gezogen.

Nachdem nun die Colonieen sich einigermaßen dem Auge merklich entwickelt hatten, wurden sie mit Hülfe des Wolfhinkel'schen Zählapparates gezählt und die Anzahl der Pilze auf einer Platte wurde mit der Verdünnungsziffer multiplicirt, um den jedesmaligen Pilzgehalt eines Cubikcentimeters der untersuchten Milchprobe zu erhalten.

War der Pilzgehalt bestimmt, so konnten die Platten geöffnet werden und die einzelnen Culturen auf Gelatine und Agar abgeimpft und makroskopisch wie mikroskopisch untersucht werden, um die verschiedenen Pilzarten von einander unterscheiden zu lernen.

Zur mikroskopischen Untersuchung der Pilze in der Milch muss ich bemerken, dass, da es sehr schwer ist, die Mikroorganismen in nicht geronnener Milch zu färben, und so dem Auge sichtbar zu machen, weil die Caseinschollen sich dick mitfärben und die Bakterien verdecken, ich mir dies dadurch zu ermöglichen suchte, dass ich einige Tropfen Milch in einem Uhrsälchen mit einem Tropfen verdünnter Salzsäure und etwas Aether versetzte und nach 3 Minuten langem Stehen den Aether durch leichtes Erwärmen abdampfte. Nach weiteren 3 Minuten presste sich zwischen dem geronnenen Casein der Milch eine helle Flüssigkeit aus, von der ein wenig auf ein Deckgläschen gebracht und, wie gewöhnlich getrocknet, mit Fuchsin oder Methylviolett gefärbt wurde.

Auf diese Weise konnte man wenigstens Bakterien aus frischer Milch zu Gesicht bekommen, während Ver-

suche mit unbehandelter frischer Milch negative Resultate ergaben.

Zur mikroskopischen Untersuchung der Pilze in geronnener Milch eignet sich besonders gut das ausgeschiedene helle Serum zwischen den Caseingerinnseln.

Nach Auseinandersetzung der Methode, die bei den Untersuchungen im wesentlichen in Anwendung kam, komme ich zur Beantwortung der ersten Frage meines Themas:

CAPITEL I.

Pilzgehalt der frischen Milch.

Die Milch, die zur Untersuchung kam, stammte zumeist aus dem Milchgeschäft von Nussbaumer, der dieselbe von Lieferanten aus hiesiger Gegend bezieht, ferner von einigen Höfen, die hierorts ihre Niederlagen haben; ausserdem kam auch Milch direct von verschiedenen Dürrbacher und Veitshöchheimer Bauern zur Verwendung, die den grössten Theil der Einwohner Würzburgs mit Milch versorgen.

Der Pilzgehalt der frischen Milch war folgender:

Pilzgehalt der frischen Milch.

No.	Datum	Provenienz der Milch	Verdünnung der Milch	Pilzanzahl auf einer Platte	Pilzgehalt der Milch in ccm Milch	Mittl. Pilzgehalt der M. in ccm.
I	24. Nov. 1888	Nussbaumer Milchgeschäft	1:42	a) 24572 b) 38016 c) 33408	a) 1.032.108 b) 1.596.672 c) 1.403.136	1.343.972
II	6. Dec. 1888	Josephshof	1:9261	a) 126 b) 128	a) 1.166.886 b) 1.185.368	1.176.127
III	12. Dec. 1888	Josephshof	1:194481	a) 10 b) 9	a) 1.944.810 b) 1.750.329	1.897.569
IV	15. Dec. 1888	Dürrbacher Bauer	1:194481	9	1.750.329	

No.	Datum	Provenienz der Milch	Verdün- nung der Milch	Pilzanzahl auf einer Platte	Pilzgehalt der Milch in ccm Milch	Mittl. Pilz- gehalt der M. in ccm.
V	15. Dec. 1888	Veitshöch- heimer Bauer	1:194481	12	2.333777	
VI	18. Dec. 1888	Schirlinger Kindermilch	9261	24	222.264	
VII	11. Febr. 1889	Hättshof	2121	639	1.345.319	
VIII	11. Febr. 1889	Veitshöch- heimer Bauer	2121	595	1.261.995	

CAPITEL II.

Veränderung des Pilzgehaltes beim Stehen bei verschiedenen Temperaturen und Veränderungen des Säuregehaltes dabei.

Die zweite Frage zerfällt naturgemäss in verschiedene Theile. Zunächst werde ich mit Hülfe einer tabellarischen Uebersicht den ersten Teil der Frage zu beantworten versuchen, der, weil ich die Milch nach längerem Stehen in der Kälte und in der Brutwärme untersucht habe, mich nötigt, der besseren Uebersicht halber zwei getrennte Tabellen aufzustellen, von denen erstere den Pilzgehalt der Milch nach 24stündigem Stehen in der Brutwärme angibt. Zur Beantwortung des zweiten Teils der Frage: „Veränderungen des Säuregehaltes beim Stehen“ sehe ich mich veranlasst, je nachdem die Milch frisch untersucht wurde oder erst nach längerem Stehen in der Kälte und in der Brutwärme, verschiedene Tabellen aufzustellen, besonders aber auch aus dem Grunde, weil von den meisten Milchproben zu öfteren am Tage Säuretitrirungen gemacht worden sind, um das progressive Fortschreiten der Säurebildung zu beobachten.

Pilzgehalt der Milch nach 24 Stunden in der Kälte.

No.	Datum		Provenienz	Temperatur		Verdünnung	Anzahl der Pilze auf einer Platte	Pilzgehalt eines cem Milch	Mittlerer Pilzgehalt eines cem Milch
	Milch exponirt	Platte angefertigt		Anfang	Ende				
I	30. 11. 88	31. 11. 88	Nussbaumer Milchgeschäft	9,2 ⁰	10,2	1:2121	12020	25.494.420	
II	6. 12. 88	7. 12. 88	Josephshof	3,4 ⁰	2 ⁰	1:9261	a) 318 b) 286	a) 2.944.998 b) 2.648.846	{ 2.796.922
III	11. 12. 88	12. 12. 88	Josephshof	1,3 ⁰	4 ⁰	1:194481	a) 9 b) 11	a) 1.750.329 b) 2.140.291	
IV	15. 1. 89	16. 1. 89	Nussbaumer	— 4 ⁰	— 2 ⁰	1:4007	a) 74 b) 90	a) 296000 b) 366000	{ 331000
V	23. 1. 89	24. 1. 89	Nussbaumer	+ 2 ⁰	— 3,2 ⁰	1:194481	a) 9 b) 12	a) 1.750.329 b) 2.233.372	
VI	24. 1. 89	25. 1. 89	Nussbaumer	— 3,2 ⁰	+ 2,4 ⁰	1:194481	12	2.233.372	
VII	11. 2. 89	12. 2. 89	Hättshof	+ 0	— 5 ⁰	1:10201	96	979296	
VIII	11. 2. 89	12. 2. 89	Veitshöchheimer Bauer	+ 2 ⁰	— 5 ⁰	1:10201	82	836482	

Pilzgehalt der Milch in der Brutwärme.

No.	Versuchs-Dauer in Stunden	Provenienz der Milch	Temperatur		Pilzgehalt der Milch — frisch im ccm Milch	Verdünnung der Milch	Anzahl der Pilze auf einer Platte	Pilzgehalt eines ccm Milch	Im Mittel Pilzgehalt eines ccm Milch — rund	Consistenz
			Anfngs.	Ende						
I	24	Josephshof	22,3 ⁰	24 ⁰	a) 1.166.886 b) 1.185.363	1:9261	a) 28620 b) 30709	a) 265.049.820 b) 84.404.310	{ 274.000.000	flüssig
II	24	Josephshof	24 ⁰	25 ⁰	a) 1.944.810 b) 1.750.329	1:194481	a) 16027 b) 14882	a) 3116.946.988 b) 2894.266.242	{ 3005.000.000	coagulirt
III	24	Dürnbacher Bauer	23,0	22,1 ⁰	1.750.329	1:194481	11893	2312.962.533		Im Beginn zu coagul.
IV	24	Veitshöchheimer Bauer	23,2 ⁰	22,1 ⁰	2.333.772	1:194481	18316	3571.369.780		coagulirt
V	24	Nussbaumer Milchgeschäft	25 ⁰	30 ⁰		1:125000	1408	176.000.000		flüssig
VI	7	Nussbaumer Milchgeschäft	26,2 ⁰	27 ⁰	a) 1.750.329 b) 2.333.772	1:194481	a) 512 b) 537	a) 99.572.272 b) 108.325.907	{ 104.000.000	flüssig
VII	25	Nussbaumer	26,2 ⁰	28 ⁰	"	1:194481	1075	4390.408.575		coagulirt
VIII	5	Hätthof	25,1 ⁰	24,5 ⁰	1.345.319	1:10201	4672	47.659.072		flüssig
IX	5	Veitshöchheimer Bauer	25,1 ⁰	24,5 ⁰	1.261.995	1:10201	4763	48.587.363		flüssig
X	23	Hätthof	25,1 ⁰	25 ⁰		1:40401	25654	1036.447.254	{ 1223.000.000	Im Beginn zu coagul.
XI	23	Veitshöchheimer Bauer	25,1 ⁰	25 ⁰		1:40401	34862	1408.959.962	{ 1223.000.000	Im Beginn zu coagul.

In den folgenden drei Tabellen möge eine Zusammenstellung gegeben sein von den Veränderungen des Säuregehaltes der Milch nach längerem Stehen bei verschiedenen Temperaturen im Vergleich zu dem Säuregehalt der frischen Milch.

Die Titrirungen wurden nach zwei Methoden ausgeführt. Die eine, die von Pfeiffer angegeben ist, besteht darin, dass zu 10 ccm Milch 40 ccm dest. Wasser zugesetzt werden, zu welcher Verdünnung 3 Tropfen einer Phenolphthaleinlösung gebracht werden. Alsdann wird solange $\frac{1}{4}$ Norm. KOH zugesetzt, bis die erste Spur einer Rosafärbung auftritt, die beim Umschütteln nicht mehr verschwindet. Diese Methode hat einen gewissen Vorzug vor einer anderen, von Soxhlet geübt, weil man erstens weniger Milch nöthig hat und zweitens bedeutend leichter sich in verdünnter Milch die eintretende Rosafärbung erkennen lässt, was auch zur Folge hat, dass die Titre nach Pfeiffer durchschnittlich um einige Zehntel niedriger sind als die nach der Soxhlet'schen Methode gefundenen; natürlich müssen die Titre nach Pfeiffer gemäss der geringeren Milchmenge mit 10 multiplicirt werden.

Säuregehalt der frischen Milch.

No.	Datum	Provenienz	Titre nach Pfeiffer	Titre nach Soxhlet
I	11. 12. 88	Nussbaumer	10 = 0,7	100 = 9,3
II	12. 12. 88	Josephshof	10 = 0,7	100 = 9,9
III	15. 12. 88	Dürrbacher Bauer	10 = 0,7	100 = 9,6
IV	15. 12. 88	Veitshöchheim. Bauer	10 = 0,7	100 = 8,8
V	18. 12. 88	Nussbaumer Kinderm.	10 = 0,8	100 = 9,3
VI	16. 1. 89	Nussbaumer	10 = 0,8	
VII	24. 1. 89	Nussbaumer	10 = 0,7	
VIII	11. 2. 89	Veitshöchheim. Bauer	10 = 0,7	100 = 9,8
IX	11. 2. 89	Hättshof	10 = 0,8	100 = 9,7

Säuregehalt der Milch, die in der Kälte gestanden.

No.	Provenienz	Temperatur		Wie viel St. gest. ?	Titre nach Pfeiffer	Titre nach Soxhlet
		Exponirt	Titirt			
I	Nussbaumer	— 4 ⁰	+ 2 ⁰	48	10 = 0,9	100 = 9,4
II	Josephshof	10 ⁰	8 ⁰	24	10 = 0,9	100 = 9,9
III	Nussbaumer	— 3,2 ⁰	+ 2,4 ⁰	36	10 = 0,7	100 = 9,6
IV	Hättshof	+ 2 ⁰	— 5 ⁰	24	10 = 0,8	100 = 9,3
V	Veitshöchheimer	+ 2 ⁰	— 5 ⁰	24	10 = 0,7	100 = 9,5

Säuregehalt der Milch, die in der Brutwärme gestanden.

No.	Provenienz	Temperatur		Wie viel St. gest?	Titra nach Pfeiffer	Titre nach Soxhlet	Consistenz zur Zeit der Titirung
		Exp.	Titr.				
I	Nussbaumer Milchgesch.	26 ⁰	28 ⁰	24	10 = 3,4	—	coagulirt
II	Josephshof	26 ⁰	25 ⁰	8	10 = 0,8	100 = 9,3	flüssig
				21	10 = 2,6	100 = 30,0	"
				24	—	—	"
				24 ^{3/4}	10 = 3,0	100 = 34,0	gel. geronn.
				33	10 = 3,1	100 = 36,3	"
				35	10 = 3,6	100 = 37,0	käs. geronn.
III	Dürrbacher Bauer	23,3 ⁰	22,1 ⁰	6	10 = 0,8	100 = 10,0	flüssig
				9	10 = 0,9	100 = 10,0	"
				26	10 = 2,8	100 = 30,3	i. Beg. zu ger.
				48	10 = 3,6	200 = 42,0	käs. geronn.
IV	Veitshöchl. Bauer	23,3 ⁰	22,1 ⁰	6	10 = 0,7	100 = 8,8	flüssig
				9	10 = 0,7	100 = 8,9	"
				26	10 = 2,8	100 = 32,2	gel. geronn.
				48	10 = 3,4	100 = 39,7	kas. geronn.
V	Nussbaumer Milchgesch.	26,2 ⁰	27 ⁰	8	10 = 0,8	100 = 10,2	flüssig
				25	10 = 4,1	100 = 43,8	geronnen
VI	Hättshof	25,1 ⁰	24,5 ⁰	6	10 = 0,8	100 = 9,2	flüssig
				23	10 = 3,5	100 = 37,8	geronnen
VII	Veitshöchl. Bauer	25,1 ⁰	24,5 ⁰	6	10 = 0,8	100 = 9,7	flüssig
				23	10 = 3,5	100 = 34,4	i. Beg. zu ger.

CAPITEL III.

Die typischen Bacteriensorten der Würzburger Milch.

Bei dem hohen Pilzgehalt der Milch und bei der scheinbaren Aehnlichkeit der Colonien war es anfangs schwer, die Bacterienarten, die bei den verschiedenen Versuchen sich einstellten, zu unterscheiden. Die Platten zeigten stets, wenn nicht zu stark mit Keimen besät, dasselbe Bild von wachstropfenähnlichen Colonien, die bald mehr bald weniger glänzend weiss erschienen, deren Rand bald glatt bald etwas unregelmässiger gestaltet war. Erst durch Versuche mit grösstmöglicher Verdünnung der Milch gelang es, die darin sich findenden Bacterienarten besser beobachten zu können, um differentielle Punkte, charakteristische Merkmale der einzelnen Pilze zu finden. Auch das Verimpfen der Bacterien auf verschiedene Nährböden brachte weiter differentiell wichtige Punkte, die es mir ermöglichten, fünf Bacterienarten von einander zu scheiden und sie als typische Milchbacterien der hiesigen Milch zu bezeichnen.

I. Weisser Porzellancokkus.

Diese Cokkenart bildet auf Gelatine wie auf Agar einen weissen, dicken, porzellanglänzenden Belag. Er entwickelt sich aus kleinsten Colonien, die, wenn sie isolirt innerhalb des Nährbodens liegen, bis zur Grösse eines kleinen Stecknadelkopfes heranwachsen; liegen sie mehr oberflächlich, so breiten sie sich, sobald die Colonien an die Oberfläche gelangt sind, mehr in die Fläche aus und erreichen die Grösse einer Linse. Der Rand der Colonie ist auf Agar glatt, auf Gelatine etwas gezackt. Die Colonien gleichen makroskopisch denen des

Milchsäurebacillus, und sind im Anfang damit leicht zu verwechseln. Erst nach ungefähr 36 Stunden zeigen die grösseren Colonien das porzellan glänzende Aussehen gegenüber der mattweissen Färbung der Milchsäurebacilluscolonie.

Als Stichkultur wächst er längs des Stichkanals als anfangs zarte, später mehr körnige Auflagerung; an der Oberfläche breitet er sich rasch aus, Gelatine verflüssigt er nicht. Der oberflächliche Teil ist etwas gelappt und glänzt, ist porzellanweiss.

Auf Kartoffeln konnte ich kein deutliches Wachsthum bemerken. Hierin scheint er sich von dem Escherich'schen Porzellancoccus (Darmbakterien des Säuglings 1886) zu unterscheiden, der auf Kartoffel ziemlich rasch wächst als weisse, saftig glänzende Colonie; im übrigen stimmt er mit dem Porzellancoccus von Escherich überein.

Mikroskopisch präsentirt er sich als kleine Cokken, von regelmässiger Form, stets zu Haufen gruppiert.

Auf sterilisirte Milch geimpft erwies er sich als indifferent, wenigstens zeigte dieselbe nach 6tägigem Stehen in der Brutwärme keine Spur von Gerinnung. Bei einem Versuch zeigte die Milch eine eben zu bemerkende schwach saure Reaction, bei anderen blieb sie alkalisch wie zuvor.

Auf sterilisirte Fleischextract-Milchzuckerlösung rief er keine wesentlichen Veränderungen hervor. Die anfangs schwach alkalische Reaction ging bei einem Versuch in eine schwach saure über, in mehreren anderen Fällen behielt sie ihre Alkalescentz. Die Nährlösung veränderte ihre Durchsichtigkeit nicht; wohl waren an den Wänden des Reagenzglases kleine Flöckchen bemerkbar, die die Wände wie mit Feuchtigkeit beschlagen erschienen liessen.

Das gleiche gilt von der Lösung, die mit Læmus versetzt war.

II. Schleiercokkus.

Derselbe fand sich bei allen Milchversuchen, besonders bei Culturen mit frischer Milch, äusserst zahlreich vor. Durch sein rasches Flächenwachsthum innerhalb der Gelatine erschwerte er oft das Zählen der Pilze dadurch, dass seine Colonien, wenn mehrere dicht bei einander lagen, confluirten, und so ganze Flächen der Gelatine wie mit einem Schleier überzogen. Die Colonien entwickeln sich aus kleinsten stark lichtbrechenden Pünktchen, die sich rasch zu helldurchscheinenden, dünnen, perlmutterglänzenden Scheiben ausbreiten, die oft die Grösse eines Zehnpfennigstückes erreichen und fast ausschliesslich nur in der Tiefe des Nährbodens liegen. Der Rand der Colonien ist, solange sie noch die Grösse einer Linse haben, glatt und die Colonie kreisrund, wird sie grösser, unregelmässig.

Mikroskopisch stellt diese Bacterienart kleine Cokken dar, die in Häufchen liegen. Im Reagenzglas auf Gelatine ist sein Wachsthum fast ausschliesslich auf die Oberfläche beschränkt, die es ganz langsam mit einem glasigen, gezackten, trockenen Beleg überwuchert.

Der Stichkanal ist ganz dünn, in eine Spitze auslaufend, durchsichtig. Gelatine verflüssigt er nicht.

Im Stich auf Agar bildet er eine dünne durchsichtige Umhüllung des Kanals, auf der Oberfläche breitet er sich als kreisrunder, grauweisser Belag aus, der wie aus lauter Radian zusammengesetzt erscheint, die vom Mittelpunkt, dem Einstich, ausgehen.

Auf Kartoffel wächst er ziemlich rasch, indem er einen mässig dicken, glasigen Belag bildet, der an den

Rändern fingerförmige Ausläufer zeigt. Die Umgebung der Kartoffelcultur ist blaugrau verfärbt.

In steriler Milch ruft er keine Veränderungen hervor; die Reaction derselben ändert sich nicht, keine Gerinnung.

In Fleischextract-Milchzuckerlösung entwickelt er sich, ruft aber keine Reactionsveränderungen hervor. Die Nährlösungen ohne und mit Zusatz von Lacmus trüben sich nach 3 × 24 Stunden.

III. Grün fluorescirender, verflüssigender Bacillus.

Derselbe war bei allen Culturen stets in grosser Anzahl vorhanden und war wegen seiner Eigenschaft, die Gelatine äusserst rasch zu verflüssigen, die Ursache, die Milchversuche nur mit Agar-Agar vorzunehmen; ehe noch die übrigen Pilzformen bei den Culturversuchen mit Gelatine sichtbar wurden, war schon die Gelatine in eine flüssige Masse umgewandelt, die grün fluorescirte und einen stechenden ammoniakalischen Geruch hatte. Die Anwesenheit von Ammoniak fand sich auch dadurch bestätigt, dass angefeuchtetes rotes Lacmuspapier an die Innenfläche des Dosendeckels gebracht schon nach zwei Minuten intensiv blau wurde. Setzte man zur verflüssigten grünen Gelatinemasse blaue Lacmusflüssigkeit, so nahm sie eine violette Farbe an, die auf Zusatz einer Spur Säure in Rot überging.

Auf Agar kommen die Pilze ebenfalls rasch zur Entwicklung und präsentiren sich als linsengrosse, schmutzigweisse Plaques mit granulirter Oberfläche und unregelmässig verlaufendem Rande. Die grüne Fluorescenz der Colonien dehnt sich auf die sie umgebende Agarmasse aus.

Im Reagenzglas entwickelt er sich als Stichcultur äusserst rasch, und zwar bildet er in der Gelatine schon 3—4 Stunden nach der Impfung eine kleine trichterförmige Einsenkung. Nach ungefähr 12 Stunden bildet sich eine kegelförmige Verbreiterung des Stichkanals durch Verflüssigung der Gelatine. Die Verflüssigung breitet sich rasch seitlich und in die Tiefe aus in der Weise, dass sich eine Endanschwellung an der Spitze des Kegels bildet, der solange nach unten wächst, bis die Verflüssigung an der Oberfläche der Gelatine die Wand des Reagenzglases erreicht hat; alsdann weitet sich der Kegel nach unten aus, bis schliesslich die Verflüssigung in Cylinderform fortschreitet, an deren Grund sich eine 3—4 mm dicke gelbe Pilzwolke befindet. Die Flüssigkeitssäule fluorescirt intensiv grün in allen Theilen gleichmässig; die Fluorescenz verbreitet sich nicht auf den noch festen Teil der Gelatine. Auf der Oberfläche der Verflüssigung ist eine zarte grauweisse Membran ausgespannt.

Im Stich auf Agar-Agar wächst er, indem sich zunächst der Stichcanal mit einem gelben Belag anfüllt; darauf bildet sich auf der Oberfläche, vom Einstich ziemlich gleichmässig ausgehend, ein blassgrauer mattglänzender Belag; ist derselbe ungefähr linsengross geworden, so beginnt die Agarsäule, soweit der Stichcanal reicht, stark grün zu fluoresciren.

Bei älteren Culturen lagert sich eine dünne, grauweisse Decke auf den oberflächlichen Belag, unter welcher die grüne Farbe hervorschimmert.

Auf Kartoffel bildet er eine flache zehnpfennig- bis markstückgrosse, hellgelbe Colonie, die nach einigen Tagen in der Brutwärme eine orangerote Färbung zeigt.

Diese Art von *Bac. fluorescens liq.* scheint dem von Escherich im Inhalt der *pars pylorica ventriculi* des Kindes gefundenen nahe zu stehen; nur ist bei dem von mir aus hiesiger Milch gezüchteten hervorzuheben, dass er auf Agar eine deutliche Fluorescenz hervorruft, was dem Escherich'schen abgeht. Ferner trübt er die vorher hell gewesene Gelatine mit der Verflüssigung nicht, welche Eigenschaft Escherich bei dem von ihm gefundenen besonders bemerkt.

Auch ist der mikroskopische Befund ein etwas anderer; Escherich sagt von seinem *Fluorescens*, dass die kurzen, plumpen Stäbchen meist einzeln oder in Gruppen, selten in Form von Doppelstäbchen gelagert seien, während die in Milch gefundenen oft zu zweien, ja oft zu vierten aneinander liegen. Auch sind die Einzelstäbchen aus Reinculturen gefärbt, wenn auch klein, so doch nicht plump, sondern dünn und zierlich zu nennen.

Hüppe scheint einen ähnlichen *Fluorescens* in der Milch gefunden zu haben, jedoch lässt sich aus seiner kurzen Beschreibung dieser seiner Bacterienart kein Vergleich anstellen mit der in hiesiger Milch vorkommenden. Nur dies lässt sich aus der Hüppe'schen Darstellung mit Bestimmtheit erkennen, dass diese beiden *Fluorescens*arten in einem Punkt wesentlich verschieden sind; es bildet nämlich der *Fluorescens* von Hüppe keine Säuren und Gerinnung, während der in hiesiger Milch vorkommende in kurzer Zeit *Coagulation* der Milch bewirkt.

Ferner hat Rosenberg im Mainwasser unterhalb der Stadt Würzburg einen *Bac. fluor. liq.* gefunden (Archiv für Hygiene V. Bd. pag. 408), der in seinen Eigenschaften dem aus Milch cultivirten sehr nahe steht. Der Rosenberger'sche *fluorescirt* auch auf Agar-Agar,

sein Wachsthum auf Agar ist dasselbe; auf Gelatine zeigt er einige Unterschiede in seiner Entwicklung. Die Verflüssigung ist keine kegelförmige und die Fluorescenz ist nicht immer deutlich auf Gelatine, während bei dem in der Milch gefundenen stets die Verflüssigung im Stichcanal beginnend immer kegelförmig sich ausbreitet und stets eine grasgrüne Fluorescenz zeigt.

Noch möchte ich einer Wahrnehmung gedenken, die E. Fick an einem *Bacillus fluorescens liquefaciens* gemacht hat, den er vom Verbande eines normal heilenden Cataractoperirten entnommen und cultivirt hat. Er fand in den Culturen eine längere und eine kürzere Form der Bacillen. Die längeren Formen erscheinen nach der Färbung wie ein blasser Schlauch, an dessen Ende zwei gefärbte Körnchen liegen, deren auch zuweilen vier sein können; die kürzeren Bacterien färbten sich gleichmässig, eine Wahrnehmung, die ich an dem aus Milch gezüchteten in vollem Umfang bestätigt finde. Die Färbung hierbei geschah mit Fuchsinlösung, die nur $\frac{1}{2}$ Minute auf dem Präparate gelassen, und dann abgespült wurde. Das Präparat wurde getrocknet und nicht, wie es sonst zu geschehen pflegte, durch die Flamme gezogen. Besonders gut eignen sich hierzu Präparate, die von sterilisirter Fleischextract-Milchzuckerlösung angefertigt sind, die mit dieser Bacterienart inficirt war, wo die Einzelstäbchen stets eine grössere Länge erreichten.

Auf 10 ccm sterilisirte Milch verimpft macht er dieselbe gerinnen. Folgende Versuche mögen hier angeführt sein:

No.	Datum der Impfung	Geronnen nach wie viel Stunden?	Consistenz	Titre nach Pfeiffer
I	8. I. 89	27	gelatinös	10 = 3,0
II	11. I. 89	32	gelatinös	10 = 3,4
III	15. I. 89	25	gelatinös	10 = 3,2
IV	4. II. 89	26	gelatinös	10 = 3,2

Diese vier Versuche zeigen, dass diese Bacterienart die Milch nach circa 27 Stunden gelatinös gerinnen macht; stets setzt sich auf der coagulirten Masse sofort eine hellgrüne seröse Flüssigkeit ab, auf welcher die Rahmschicht sich befindet, die deutlich grün gefärbt ist. Nach wenigen Tagen wird das Casein-Gerinnsel peptonisirt, indem die Menge des Serums auf Kosten des Coagulums zunimmt, das bis auf einige Bröckel sich auflöst. Der Peptonnachweis war trotz der geringen Peptonmenge, die sich bei den 10 ccm Milch bilden konnte, möglich.

Die geronnene Milch schmeckt bitter, reagirt sauer und zeigt einen Titre 10 = 3,2 im Mittel. Dies zeigt, dass diese Bacterienart für sich im Stande ist, nach 24 Stunden einen ebenso hohen Grad von Säurebildung in der Milch herbeizuführen, wie sie entsteht bei frischer Milch nach 24stündigem Stehen in der Brutofentemperatur durch Zusammenwirken der verschiedenen Säure bildenden Mikroorganismen.

Auf sterile Fleischextract-Milchzuckerlösung, ohne Zusatz von Lacmusflüssigkeit, verimpft machte er dieselbe nach 24 Stunden in der Brutwärme trübe, besonders des oberen Dritttheils der Flüssigkeitssäule. Eine dünne graue Membran flottirte auf der Oberfläche der Nährlösung. Die Reaction war schwach sauer und zeigte einen Titre: 10 = 0,3.

Es scheint als ob die Fermentbildung dieser Mikroorganismen in Zuckerlösung keine so ausgedehnte sei, wie in der Milch, wo sie vielleicht einen günstigeren Nährboden haben.

Mit Lacmus versetzte Fleischextract-Milchzuckerlösung entfärbte er nach 24 Stunden, die zugleich weisslich getrübt war. Schüttelte man diese Lösung längere Zeit, so erschien wieder die ursprüngliche violette Farbe. Wurde diese Manipulation öfters fortgesetzt, so kam ein Zeitpunkt, wo die violette Färbung nicht wiederkehrte; die entfärbte Nährlösung bekam alsdann einen Stich ins Rote, wurde schwach sauer und zeigt einen Titre $10 = 0,15$ bis $0,2$.

Die Entfärbung der mit Lacmus gefärbten Nährlösung und die darauf erfolgende Wiederkehr der ursprünglichen Farbe durch Schütteln beweist eine Reduction des Lacmus, eine Erscheinung, die alle Bakterien geben sollen, die Gelatine verflüssigen, wie Dahen in Frankfurt in einer Arbeit behauptet. Auch die von diesem Autor gemachte Bemerkung, dass in allen Fällen, in denen eine Reduction des Lacmus auftrat, sich gleichzeitig in den ersten Tagen eine saure Reaction der Nährlösung sich findet, trifft bei dem Fluorescens, der in hiesiger Milch vorkommt, zu, wie die oben angegebene Titrirung beweist.

IV. Fächerbacillus.

Die Colonien dieser Bakterienart zeigen eine gewisse Aehnlichkeit mit einem ausgebreiteten Fächer, diesen jedoch kreisrund gedacht. In der Mitte der Colonie befindet sich ein Punkt, von dem aus Radien nach der Peripherie ausgehen, die aus zwei dicht aneinander gelegenen Kreisen besteht, deren Ring in kleine Felder

geteilt ist, entsprechend je zweier vom Mittelpunkt kommender Radien. An den Berührungsstellen zweier Felder zeigt sich eine kleine Einkerbung. Die einzelnen Colonien entwickeln sich aus stecknadelkopfgrossen, gelben Pünktchen, die, wenn sie an die Oberfläche gelangt sind, sich bis zur Linsengrösse ausbreiten, blassweiss und durchsichtig sind.

Im Stich auf Gelatine breitet er sich auf die Oberfläche als dünner, glasiger, zäher Belag aus, der an den Rändern Verästelungen bildet; der Stichcanal ist ebenfalls mit einem glasigen, durchsichtigen Belag angefüllt.

Auf Agar-Agar ist das Wachsthum genau so wie auf Gelatine.

Mikroskopisch stellt er plumpe Stäbchen dar, die oft zu zweien oder vierten aneinander liegen. Die Stäbchen haben Aehnlichkeit mit denen des Milchsäurebacillus, welche letzteren jedoch etwas kleiner sind.

Auf sterilisirte Milch geimpft, macht er dieselbe gelatinös gerinnen und sauer.

No.	Datum der Impfung	Geronnen nach wie viel Stunden?	Titre nach Pfeiffer
I	8. I. 89	48	10 = 2,3
II	11. I. 89	52	10 = 3,1
III	15. I. 89	47	10 = 2,8
IV	4. II. 89	46	10 = 3,0

Dazu ist zu bemerken, dass die geronnene Masse eine solide Säule bildet, die unverändert bleibt, und aus der sich kein Serum ausscheidet, wie bei der Gerinnung, die der Bacillus fluorescens oder acidilactici bewirkt.

In Milchzucker-Fleischextractlösung ohne Zusatz von Lacmus verursacht er keine Trübung, wohl setzen sich

nach 24 Stunden kleine Flöckchen an den Wänden des Reagenzglases ab. Die Lösung reagirt alsdann sauer und zeigt einen Titre $10 = 0,3$.

Milchzucker-Fleischextractlösung, mit Lacmus gefärbt, vermag er nach 24 Stunden zu entfärben; nur zeigt sich an der Oberfläche der Nährlösung eine Spur von violetter Farbe. Schüttelt man gut um, so rötet sich nach einigen Minuten die Lösung, um nach längerem Stehen sich wieder zu entfärben; nach 30 Stunden tritt eine dauernde rote Färbung ein.

Auf Kartoffel wächst er als Zehnpfennigstück-grosser, gelber Belag, der späterhin bräunlich wird, wenn die Cultur der Brutwärme ausgesetzt wird.

V. Milchsäurebacillus.

(Bac. acidi lactici — Hüppe —).

In jeder rohen Milch, wie sie in den Milchwirthschaften zum Verkaufe gelangt, mag sie amphoter oder nur schwach sauer reagiren, findet sich diese Bacterienart in hiesiger Milch vor, die immer mehr von den anderen prävalirt, je saurer sie wird, je näher sie dem Gerinnungsstadium kommt. Ohne dass Gährungsversuche damit angestellt worden waren, musste dies häufige Vorkommen und die mit der Acidität fortschreitende Vermehrung dieser Bacterienart mich zur Annahme führen, dass es sich hier um den von Hüppe beschriebenen Milchsäurebacillus handele.

Die Colonien dieses Bacillus entwickeln sich aus kleinsten, wetzsteinförmigen Culturen, die deutlich weiss erscheinen. Haben diese die Oberfläche erreicht, so präsentiren sie sich bald als stecknadelkopfgrosse Erhebungen, die sich rasch bis zur Linsengrösse ausbreiten

und einen grauweissen, wachstropfenähnlichen Belag darstellen, der am Rande durchscheinend ist. Der Rand der einzelnen Colonien ist glatt, scharf markirt.

Im Stich entsteht längs des ganzen Stichcanals eine anfangs zarte, später etwas derbere Auflagerung, die an einzelnen Stellen discrete Kügelchen bildet, die dunkelgelb tingirt scheinen. Auf der Oberfläche verbreitet sich das Wachsthum rasch und bildet einen grauweissen Belag mit unregelmässigem, gebuchteten Rande. Auf Agar-Agar wie auf Gelatine ist das Wachsthum ein gleich schnelles; Unterschiede in Form und Grösse sind nicht zu bemerken, nur erscheinen die Colonien auf Gelatine massiger und weisser wie auf Agar-Agar.

Unter dem Mikroskope bildet der Bacillus kurze, dicke Stäbchen, $\frac{1}{2}$ mal länger als breit, meist zu zweien aneinander hängend. Die Einzelstäbchen können ovale Cokken vortäuschen.

Die Stäbchen sind je nach dem Nährboden, auf dem sie gewachsen sind, verschieden lang und dick. So fand ich sehr dicke Formen in Kartoffelculturen. Die Bacillen zeigen im hängenden Tropfen untersucht eine zitternde Bewegung, die wohl nur als eine moleculare aufzufassen ist.

Färbt man die Bacillen mit concentrirter Fuchsinlösung eine $\frac{1}{4}$ Minute, wäscht das Fuchsin ab, trocknet das Präparat an der Luft, wobei man es nicht nach dem Trocknen durch die Flamme ziehen darf, und betrachtet es nun unter dem Mikroskope, so bemerkt man in den schwach gefärbten Stäbchen stärker tingirte, circumscripte Stellen oder Körner, besonders an den Enden der Bacillen; zuweilen beobachtet man an beiden Enden eines Stäbchens ein Korn, so dass der von ihnen freigelassene Teil eine Vacuole vortäuschen könnte. Besonders gut

eignen sich zu diesen Untersuchungen die grösseren Bacterienformen der Kartoffelculturen.

Aehnliche Beobachtungen über isolirte, färbbare Anteile von Bacterien werden mitgeteilt in der Zeitschrift für Hygiene, Bd. V, 1888, pag. 173—190. Dort wird gesagt: „Mittelst einer neuen Methode, welche darin besteht, dass Löffler'sches Methylenblau möglichst concentrirt auf das die Bacterien in kaum getrockneten Zustande haltende Deckgläschen getropft und etwa $\frac{1}{4}$ Stunde bis zur beginnenden Austrocknung gelassen, dann leicht abgewaschen wird, hat Babes bei Cholerabacillen am Ende oder in der Mitte der im übrigen schwach blau gefärbten Stäbchen dunkelrot oder violett gefärbte Kügelchen gefunden, welche er als identisch mit den später von Ernst (Centralblatt für Bacteriologie, Bd. IV, pag. 47) beim Xerosebacillus beschriebenen und mittelst Erwärmung und Contrastfarbe sichtbar gemachten Kügelchen erklärt, dagegen nur zum Teil identisch mit den nach Hüppes Vorschrift dargestellten als dessen Arthrosporen anzusprechenden Gebilden. Die betreffenden Kügelchen sieht Verfasser als einen Farbstoffen gegenüber sich eigenthümlich verhaltenden Formbestandteil der Bacterien, aber nicht wie Ernst als Dauerzustand an, da sie weder gegen Austrocknung und Hitze sich widerstandsfähiger zeigten, noch immer gefunden werden, wenn es sich um auffallend widerstandsfähige Culturen handelte.“

Auf Kartoffel ist sein Wachsthum ein äusserst rasches, indem er innerhalb 24 Stunden den Nährboden mit einem dicken 3—4 mm hohen, schmutzig grauweissen Belag überzieht, der mit zahlreichen Bläschen besetzt ist. An einigen Stellen, wo scheinbar mehrere Bläschen zu einer grösseren Blase confluirten, hebt diese die darüber befindliche Schicht des Belags ab.

Betreffs des Wachsthumms dieses Bacillus bei niederer Temperatur möchte ich eine Wahrnehmung anfügen, die darin besteht, dass bei allen Versuchen die Pilzvegetation in der Milch, die im Kalten 24 Stunden gestanden, wenn auch nicht lebensunfähig wurde, so doch in ihrer Lebensenergie herabgesetzt erschien gegenüber der Wachsthummsgeschwindigkeit der Bacterien der Milch, die gleich lange Zeit in der Brutwärme gestanden hatte; die Colonien von Milch in der Kälte hatten ungefähr doppelte Zeit nöthig, um dem Auge sichtbar zu werden, als die Keime der Milch, die in der Wärme gestanden. Specieell für den Milchsäurebacillus suchte ich dies durch ein Experiment zu demonstrieren, das in der Weise ausgeführt wurde, dass zwei Kölbchen mit 100 ccm 0,6⁰/oiger steriler Kochsalzlösung mit Reinculturen zu gleicher Zeit beschickt wurden, wovon das eine in der Kälte bei + 2,3⁰, das andere bei + 27,3⁰ exponirt wurde. Nach 24 Stunden wurden von beiden Kölbchen Agarplatten angefertigt, indem zu je einer Platte eine Platinöse der inficirten Lösungen genommen wurde. Beide Platten wurden gleichen Temperaturen (Brutwärme) ausgesetzt; nach 24 Stunden waren die zahlreichen Culturen der stets in der Wärme gestandenen Lösung sämmtlich stecknadelkopfgross, während die wenigen Colonien aus der Impfung in der Kälte erst nach 48 Stunden als kleinste Pünktchen sichtbar wurden.

Auf sterilisirte Milch verimpft macht der Bacillus diese innerhalb 24—32 Stunden gerinnen und sauer reagirend, wie die nebenstehende Tabelle zeigt:

No.	Datum der Impfung	Geronnen nach wie viel Stunden?	Consistenz	Titre nach Pfeiffer
I	8. I. 89	32	käsige coag.	10 = 3,4
II	11. I. 89	24	gelatinös	10 = 2,0
III	15. I. 88	26	gelatinös	10 = 2,3
IV	4. II. 89	25	käsige coag.	10 = 3,0

Die Milch, die anfangs gelatinös geronnen, zeigt später hie und da einige Spalten in dem Coagulum, die Bläschen enthalten; später zieht sich das Coagulum zusammen und in den Lücken sammelt sich ein klares Serum an, das in noch späteren Stadien an der Oberfläche zwischen Rahmschicht und Coagulum auftaucht. Neben der in verhältnissmässig kurzer Zeit durch ihn erzeugten spontanen Gerinnung erzeugt er einen Säuregrad gleich dem des durch den Fluorescens hervorgerufenen, jedoch hat hier die geronnene Milch nicht den kratzend bitteren Geschmack, wie die Gerinnsel des Fluorescens, sondern einen angenehmen sauren.

Inficirte Fleischextract-Milchzuckerlösung trübt sich schon nach 12 Stunden bei $+ 30^0$, wobei sich ein Bodensatz bildet, auf dem dünne Fäden flottiren. In der Flüssigkeitssäure selbst sind massenhaft Flöckchen suspendirt. Vom Boden steigen rasch hinter einander Bläschen empor, die an die Oberfläche gekommen zerplatzen; deutliches Zeichen einer Gährung.

Die Reaction der Nährlösung war sauer und hatte den Titre 10 = 0,4.

Impfte man grössere Mengen dieser Nährlösung zwecks späteren Milchsäurenachweises mit dem Bacillus, so war schon nach 15 Stunden die Gährung in vollem Gange. Die Flüssigkeit war getrübt und auf der Ober-

fläche stand ein weisser Schaum; nach 4 Tagen sistirte die Gährung, so dass jetzt in der gegohrenen Flüssigkeit Milchsäure nachgewiesen werden konnte.

Die Milchzuckerlösung wurde zu diesem Zweck destillirt, um die noch neben der Milchsäure sich gebildeten flüchtigen Fettsäuren zur Ausscheidung zu bringen. Der Destillationsrückstand wurde bis auf $\frac{1}{3}$ der ursprünglichen Menge eingedampft, mit Aether versetzt und damit leicht umgeschüttelt. Nachdem der Aether sich klar abgesetzt hatte, wurde er abgegossen. Der Aetherextract, welcher die Milchsäure zum grössten Teil enthalten musste, wurde auf dem Wasserbade bis zur völligen Verflüchtigung des Aethers erwärmt. Die restirende geringe Menge Flüssigkeit wurde alsdann mit frisch bereitetem gut ausgewaschenen kohlsauerem Zink versetzt, um das Zinksalz der gesuchten Milchsäure zu erhalten. Es blieb denn auch schliesslich, nachdem filtrirt und das Filtrat eingedampft war, ein Syrup zurück, aus dem sich über dem Exsicator feine glänzende Crystalle in Rosettenform ausschieden, wie solche für milchsaures Zink charakteristisch sind.

In steriler Fleischextract-Milchzuckerlösung mit Lacmus gefärbt ging die violette Farbe durch die Einwirkung des Bacillus schon nach 10 Stunden in Rot über, das constant blieb und späterhin noch intensiver wurde. Die Durchsichtigkeit der Lösung war wenig verändert. Der vorhandene Bodensatz war rosarot gefärbt. Die Gährung documentirte sich durch Aufsteigen von Bläschen. Die Flüssigkeit reagirte sauer und ergab einen Titre 10 = 0,4.

Ausser den oben näher beschriebenen fünf typischen Bacteriensorten, die sich constant in der Würzburger Milch im Winter 1888/89 vorfanden, ist noch neben ver-

schiedenen Schimmelpilzen eine Pilzform zu erwähnen, die wohl mit dem vor kurzem von H. Plaut in Leipzig beschriebenen Soor zu identificiren ist.

Leider wurde nur einmal, und zwar bei den Vorversuchen, dieser Pilz gefunden, der sich später bei keinem Versuch mehr zeigte, so dass ich auf nähere Untersuchungen dieser Pilzart verzichten musste.

CAPITEL IV.

Lässt sich eine Hand in Hand gehende bacteriologische und chemische Veränderung in der Milch nachweisen?

Zur Beantwortung dieser Frage bedarf es eines Vergleiches der früher aufgestellten Tabellen über den Pilzgehalt der frischen Milch, der Milch in der Kälte und Wärme mit den Tabellen, die eine Uebersicht geben über die fortschreitende Säurebildung in der Milch bei verschiedenen Temperaturen.

Die Tabelle „Pilzgehalt der frischen Milch“ zeigt eine Durchschnittsziffer von rund 1.500.000 Pilze im ccm frischen Milch, sowie sie in den Milchwirthschaften in Würzburg zum Verkauf gelangt; dabei zeigt sie einen Säuregehalt, titirt nach Pfeiffer, 10 = 0,7 im Mittel.

Stand die Milch längere Zeit in niederen Temperaturen z. B. bei -4° bis -2° 24 Stunden, so fand keine Säuresteigerung statt und der Pilzgehalt nahm erheblich ab.

Bei einer Temperatur von $+2^{\circ}$ bis -5° und einem Pilzgehalt von 903.889 und bei $-5,2^{\circ}$ bis $+2,4^{\circ}$ und einem Pilzgehalt von nahezu 2 Millionen änderte sich der Säuregehalt nicht; höhere Pilzgehalte, selbst nach 48 Stunden, bei niederen Temperaturen habe ich nicht gefunden.

Steht aber die Milch einige Stunden in der Brutwärme z. B. 6 Stunden bei 25^0 bis 30^0 , so steigt der Pilzgehalt von $\frac{1}{2}$ Million auf 48 Millionen, nach 8 Stunden rund 104 Millionen; dabei ändert sich der Säuregehalt nicht.

Dieser Umstand, Steigerung des Pilzgehalts ohne Säurebildung, scheint ungefähr bis gegen die 20. Stunde anzuhalten, wo die Säurebildung rapide zunimmt und die Milch die ersten Gerinnungserscheinungen zeigt und dickflüssiger wird; kurze Zeit darauf coagulirt sie, in welchem Zustande sie einen durchschnittlichen Pilzgehalt von 3—4 Tausend Millionen ergibt und einen Titre 10 = 3,0. Später wird das Coagulum fester und erreicht eine käsige Consistenz, nachdem der Säuregehalt bis auf 4,1 = 10 gestiegen ist. Höhere Titre habe ich nicht gefunden.

Die Aufstellung einer genauen Curve über Pilz- und Säuregehalt der Milch bei höheren Temperaturen erfordern Versuche, wobei stündliche Pilzzählungen und Titrirungen gemacht werden können, die sehr viel Mühe und Zeit beanspruchen. Diesen Punkt musste ich leider wegen des grossen Materials, das sich bei der Bearbeitung meines Themas in jeder Richtung bot, unaufgeklärt lassen.

An meine Vorarbeit werden sich jedoch im Laufe des Sommers im hiesigen hygienischen Laboratorium andere ausgedehntere Versuche knüpfen, die in weiteren Punkten die bacteriologischen Verhältnisse der Würzburger Milch aufzuklären im Stande sein werden, abgesehen davon, dass noch zu eruiren ist, wie sich die bacteriologischen Verhältnisse der Würzburger Milch im Sommer gestalten.

CAPITEL V.

Gibt die bacteriologische Untersuchung eine Handhabe zur Beurteilung der Milch?

Anknüpfend an die frühere Bemerkung, dass niedrige Temperaturen den Pilzgehalt der frischen Milch herabsetzen, kommt bei der Beurteilung dieses Punktes der Abhandlung wesentlich die niedrige Temperatur in Betracht, bei welcher die Milch etwa vom Lande in die Stadt gebracht worden ist.

So haben Versuche ergeben, dass unreinlich gewonnene Milch vom Lande, in der Kot und Haare in grosser Menge sich vorfanden, (die wohl in erster Linie die Bakterien der Milch zutragen) wenn sie bei niedriger Temperatur zur Stadt gebracht worden war, einen verhältnissmässig niedrigen Pilzgehalt zeigte gegenüber den Milchproben, die aus notorisch besser geleiteten Milchwirthschaften stammten, aber nicht stets in absoluter Kälte gestanden hatten.

Daraus ergibt sich zunächst, dass die bacteriologische Untersuchung eine Beurteilung der Reinheit der Milch, wenigstens im Winter, nicht erlaubt.

Steht schlecht gereinigte Milch einige Stunden in der Brutwärme, so zeigt sie einen auffallend hohen Pilzgehalt im Vergleich zur gut gereinigten, eine Wahrnehmung, die sich vielleicht bei den Untersuchungen im Sommer besser verwerten lässt.

Aus allen Versuchen spricht aber mit Sicherheit, dass grösste Reinlichkeit bei der Entnahme der Milch aus der Milchdrüse der Kuh sowohl, als auch der Gefässe, in die sie gebracht wird, sowie Aufbewahrung in der

Kälte die Anzahl der Mikroorganismen beeinträchtigt; ja, es liegt nahe, anzunehmen, dass man durch starkes, andauerndes Abkühlen eine nahezu pilzfreie Milch erhalten kann.

Am resistantesten gegen Kälte scheint von den Milchbakterien der Milchsäurebacillus zu sein, der ja auch bezüglich der Fermentbildung, die zur Säurebildung und Gerinnung der Milch nötig ist, quantitativ am meisten leistet und der saueren Milch nicht den unangenehmen kratzenden Beigeschmack verleiht, wie der ebenfalls Gerinnung hervorrufende Fluorescens, der ganz besonders viel bei verunreinigter Milch zum Vorschein kommt.



